



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(S1) Classification internationale des brevets ⁶ : C12M 3/06		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/28438 (43) Date de publication internationale: 10 juin 1999 (10.06.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02548</p> <p>(22) Date de dépôt international: 26 novembre 1998 (26.11.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97/14920 27 novembre 1997 (27.11.97) FR</p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BERTIN & CIE [FR/FR]; Boîte postale 3, F-78373 Plaisir Cedex (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS [FR/FR]; 3, avenue Victoria, F-75004 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): MILANDE, Nicolas [FR/FR]; 625, avenue des Cerfs, F-40150 Hossegor (FR). DOUAY, Luc [FR/FR]; 31, avenue du Nord, F-94100 Saint Maur (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CABINET MARTINET & LAPOUX; 43, Boulevard Vauban, BP 405 Guyancourt, F-78055 St. Quentin Yvelines Cedex (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	

(54) Title: DEVICE FOR AMPLIFYING HEMATOPOIETIC CELLS AND ITS USES

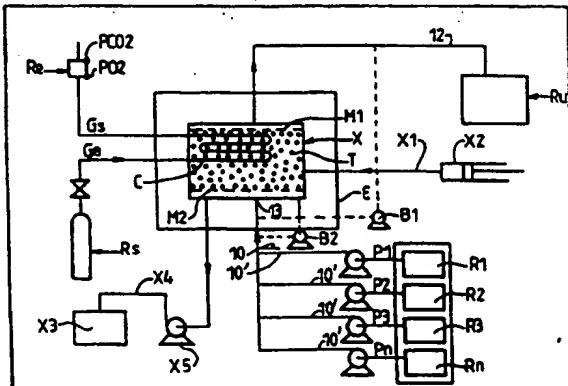
(54) Titre: DISPOSITIF D'AMPLIFICATION DE CELLULES HEMATOPOIETIQUES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract

The invention concerns a device for cell culture or bioreactor adapted for the culture of hematopoietic cells and its applications. Said device comprises a cell cultivation chamber (X), defined by an enclosure and wherein the cells to be amplified are confined; said device is characterised in that: said cultivation chamber comprises an internal wall consisting of a micronic screen (M₁) with a pore diameter ranging between 0.1 and 2 µm, constituting at least the downstream internal wall of the cell cultivation chamber; it includes a set of capillaries (C) with gas-permeable wall; and said chamber further comprises: an input collector (13) of the culture medium co-operating with means supplying fresh culture medium (R₁...R_n; 10, 10'), means for supplying different growth factors and separate regulating means (P₁...P_n) and sequential to inflow of the fresh culture medium and growth factors, said regulating means enable to obtain a variable flow rate of the culture medium ranging between 0 and 50 chamber-volumes per day and an output collector (14) of the culture medium co-operating with pressurising means; and means for inoculating (X₁, X₂) the cells to be amplified; and means for collecting (X₃) the amplified cells.

(57) Abrégé

Dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur adapté à la culture de cellules hématopoïétiques ainsi que ses applications. Ce dispositif comprend une chambre de culture cellulaire (X), délimitée par une enceinte et dans laquelle les cellules à amplifier sont confinées; ce dispositif est caractérisé: en ce que ladite chambre de culture comprend une paroi intérieure constituée par un tamis micronique (M₁) qui présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 µm, et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire, en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, et en ce que ladite chambre de culture comporte, en outre: un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture frais (R₁...R_n; 10, 10'), des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation (P₁...P_n) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, ledit moyen de régulation permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que des moyens d'ensemencement (X₁, X₂) des cellules à amplifier et des moyens de collecte (X₃) des cellules amplifiées.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

DISPOSITIF D'AMPLIFICATION DE CELLULES HEMATOPOIETIQUES ET SES APPLICATIONS

La présente invention est relative à un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur adapté à la culture de cellules hématopoïétiques (cellules sanguines, 5 progéniteurs hématopoïétiques et cellules souches) ainsi que ses applications : procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques, en milieu stérile, appareil et kit de culture.

Les cellules sanguines circulantes morphologiquement reconnaissables incluent les érythrocytes, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les différents lymphocytes et les plaquettes. Ces cellules matures dérivent de 10 cellules précurseurs : érythroblastes pour les érythrocytes, myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes pour les différents granulocytes et mégakaryocytes pour les plaquettes. Les cellules précurseurs dérivent elles-mêmes de cellules plus primitives : les cellules souches et les progéniteurs.

15 Les cellules souches ont une capacité d'auto-renouvellement et d'auto-maintien étendue ; certaines des cellules souches se différencient selon les besoins, alors que d'autres s'auto-renouvellent pour maintenir un *pool* de cellules souches, apte à répondre à la demande. Ainsi, outre la possibilité d'assurer leur renouvellement, les cellules souches pluripotentes sont capables de différenciation en différentes lignées de progéniteurs qui présentent une capacité d'auto-renouvellement plus limitée. Ces progéniteurs, sont capables de prolifération et de différenciation sous la 20 forme de cellules précurseurs reconnaissables morphologiquement.

25 Les cellules souches et les progéniteurs constituent un très faible pourcentage des cellules nucléées de la moelle osseuse, de la rate, du sang périphérique et du sang de cordon.

La reconstitution du système hématopoïétique, dans les pathologies où une telle reconstitution est nécessaire, est généralement réalisée par transplantation de moelle osseuse. Dans une transplantation de moelle osseuse réussie, le sang, la 30 moelle osseuse, la rate, le thymus et les autres organes de l'immunité du receveur sont renouvelées avec les cellules issues du donneur.

Toutefois, la greffe de moelle osseuse présente les inconvénients des transplantations (réaction du greffon contre l'hôte, par exemple), qui sont sources de mortalité et de morbidité.

C'est pourquoi d'autre sources de cellules hématopoïétiques et 35 notamment de cellules souches ont été recherchées. Toutefois, l'utilisation directe aussi bien du sang périphérique que des cellules d'autres origines (cellules de foie fœtal, sang de cordon), qui ont été testés comme source de cellules souches, en vue d'une reconstitution hématopoïétique, fournissent des résultats variables. En effet, la transplantation de cellules souches est limitée par plusieurs facteurs : les procédures

d'obtention de cellules à partir de moelle osseuse sont fastidieuses et le nombre de cellules utiles obtenues est limité. En outre, la cinétique de régénération des cellules sanguines matures après transfusion n'est pas idéale.

Afin de pallier les inconvénients, induits par l'utilisation de cellules de diverses origines, des méthodes de manipulation *ex vivo* des cellules hématopoïétiques ont été proposées, qui s'inspirent des travaux réalisés dans le domaine des manipulations génétiques.

Certaines conditions doivent être respectées pour la production de cellules : (1) il doit s'agir de cellules du sujet à traiter ou d'un donneur, qui sont capables de réplication et de différenciation, quand nécessaire et (2) l'on doit disposer d'un système *ex vivo*, adapté à la croissance des cellules concernées (matériaux d'adhésion des cellules, échange de milieu, oxygénation...).

Des systèmes de culture de cellules hématopoïétiques ont déjà été proposés, par expansion des cellules souches *ex vivo*, dans des conditions qui ont été élaborées au fil des ans (S.G. Emerson, *Blood*, 1996, 87, 3082-3088).

A l'heure actuelle, il existe essentiellement deux grandes techniques :

- les cultures à long terme conventionnelles de cellules sélectionnées : on incube, par exemple, des cellules CD34⁺ avec une combinaison de cytokines à hautes doses (*high dose cytokines* ou HDC) ; toutefois ces cultures ne correspondent pas à une vraie expansion des cellules souches mais correspondent plutôt à une différenciation efficace de progéniteurs. En effet, les cultures à long terme (CLT) doivent être entretenues par une demi-dépopulation du milieu et des cellules, une à deux fois par semaine ; une telle procédure limite la persistance des cellules souches hématopoïétiques. De tels systèmes ne permettent pas de contrôler la tension d'oxygène, le pH et les métabolites. Lorsque les cytokines sont ajoutées régulièrement, les problèmes de déplétion en facteurs nutritifs sont exacerbés, en raison notamment de l'augmentation importante de la prolifération cellulaire. La limitation de la production des cellules hématopoïétiques en culture est due, en partie, à des conditions d'entretien de la culture suboptimales. En effet, les progéniteurs hématopoïétiques en CLT sont en cycle, uniquement pendant les un à trois jours qui suivent le renouvellement de tout ou partie du milieu, et restent dormants jusqu'au prochain entretien. Le retrait du milieu de culture affecte particulièrement la fonction des cellules stromales (production de GM-CSF ou *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, Emerson G.S, 1996, précité), lors des changements de milieu. En outre, l'accumulation de cellules matures dans la culture entraîne une augmentation de la production des inhibiteurs de prolifération. L'augmentation du rythme de

changement de milieu améliore considérablement la productivité et la longévité de ce type de culture. Toutefois, de telles cultures ont l'inconvénient majeur de ne pas permettre d'obtenir des densités cellulaires élevées.

- les cultures en perfusion continue : il s'agit de systèmes (bioréacteurs) qui développent les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, dans lesquels le milieu de culture frais est apporté en perfusion continue ; de tels systèmes permettent ainsi un échange rapide du milieu, stimulent la fonction des cellules stromales et stimulent la production de GM-CSF. De telles cultures ont notamment été décrites dans les publications au nom de M.R. Koller et al. (*Blood*, 1993, 82, 2, 378-384 ; *Exp. Hematol.*, 1995, 23, 1275-1283). Les bioréacteurs utilisés sont issus des technologies de culture de cellules animales et sont plutôt conçus pour récupérer les molécules synthétisées par les cellules. C'est le cas pour les systèmes dits à fibres creuses tels que décrits dans les Demandes de Brevets européens EP 0 220 650, EP 0 480 400 et EP 0 537 551. De tels systèmes sont peu adaptés à la culture des cellules elles-mêmes ; en effet, dans ces systèmes, le milieu nutritif, dans lequel l'oxygène est dissous, passe au travers de fibres creuses et perfuse à travers elles vers la zone de culture (espace entre les fibres), ce qui entraîne un épuisement rapide de l'oxygène par rapport aux autres nutriments, lorsque les concentrations cellulaires sont élevées.

En vue d'adapter les bioréacteurs à la culture des cellules, et notamment de rendre les cultures de cellules biologiques, et plus particulièrement de cellules hématopoïétiques, reproductibles, la Demande Internationale WO 96/40858 décrit un système de culture de cellules hématopoïétiques qui comprend une chambre de culture cellulaire délimitée par une paroi inférieure en plastique sur laquelle sont distribuées les cellules à cultiver et une paroi supérieure qui se présente sous la forme d'une membrane perméable aux gaz et imperméable aux liquides. Le milieu de culture frais est introduit dans cette chambre de culture, sous pression d'air et à débit déterminé (formation de bulles dans le milieu) ; l'oxygène et les autres gaz sont introduits dans la chambre par l'intermédiaire de la paroi supérieure (membrane), à partir d'une chambre de réception des gaz.

Tant pour l'inoculation des cellules que pour l'introduction du milieu frais, le système est positionné sur un premier instrument de contrôle comportant une plate-forme de réception dudit système de culture, qui est soumis à une agitation, alors que pour la culture proprement dite (environ pendant deux semaines), le système, également soumis à une agitation séquentielle, est transféré sur un deuxième instrument de contrôle (incubateur). Le système décrit dans cette

Demande Internationale comprend en outre des moyens d'évacuation du milieu de culture usé et des moyens de récupération des cellules.

Un tel système est mieux adapté à la culture de cellules hématopoïétiques ; toutefois, il présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients :

- 5 - le milieu de culture est apporté sous pression d'air, qui est néfaste pour l'amplification des cellules hématopoïétiques (croissance faible des cellules) ;
- la répartition des cellules par agitation n'est pas homogène et peut également nuire à la croissance ;
- le transfert du système du premier instrument de contrôle vers le 10 deuxième instrument de contrôle (incubateur) alourdit la procédure ;
- l'oxygène, fourni par l'intermédiaire de la paroi supérieure de la chambre de culture (membrane), n'est pas réparti de manière homogène dans toute la zone de culture ; et
- le système n'est pas adapté à une optimisation des conditions de 15 culture (combinaison optimale en facteurs de croissances, par exemple).

D'autres systèmes ont également été décrits pour l'expansion de cellules thérapeutiques ; en particulier, le Brevet US 5 622 857 décrit un bioréacteur comprenant une chambre de culture de cellules qui contient un faisceau central de fibres creuses poreuses pour le passage du milieu frais, disposé selon l'axe 20 longitudinal de la chambre et entouré d'un faisceau annulaire de fibres creuses perméables aux gaz ; ils ne permettent pas une répartition homogène des gaz et des réactifs dans l'ensemble de la chambre de culture et peuvent entraîner un colmatage.

En conséquence, les Inventeurs se sont donné pour but de pallier ces inconvénients en proposant un système, dans lequel :

- 25 - l'apport d'oxygène est contrôlé de manière indépendante de l'apport de milieu nutritif, en continu et avec une répartition homogène sur toute la zone de culture et ce, en évitant tout contact avec l'air et toute formation de bulles dans la zone de culture ; et
- il est possible de modifier les conditions de culture à tout moment, 30 afin de maintenir des conditions optimales de croissance des cellules hématopoïétiques.

La présente invention a pour objet un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques, du type comprenant une chambre de culture cellulaire, délimitée par une enceinte et dans 35 laquelle les cellules à amplifier sont confinées, lequel dispositif est caractérisé :

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comprend au moins une paroi intérieure constituée par un tamis micronique assurant le confinement des

cellules en suspension dans un milieu de culture liquide et permettant la sortie du milieu usé, lequel tamis micronique présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 μm , et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire,

- en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, et

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comporte, en outre :

- un collecteur d'entrée de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture frais, des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation (pompes, électrovannes, ...) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que

- 15 - des moyens d'ensemencement des cellules à amplifier et
- des moyens de collecte des cellules amplifiées.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le dit milieu frais est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration frontale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit dispositif, le dit milieu de culture est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration tangentielle, au moyen d'une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu de culture frais, rigides et de diamètre compris entre 1 mm et 20 mm, montés en parallèle entre ledit collecteur d'entrée et ledit collecteur de sortie, lesdits tubes (T) étant montés dans un circuit en boucle fermée et parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu de culture frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi, pour maintenir une pression entraînant une perte de charge, lorsque le milieu de culture frais traverse les parois des tubes, supérieur à 10 mbars.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, le débit du milieu parcourant chaque tube (T) correspond à une vitesse d'écoulement, comprise entre 0,1 et 1 dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

Selon une modalité avantageuse de ce mode de réalisation, l'ensemble des capillaires (C) sont disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes (T), un/plusieurs sous-ensembles.

L'apport de milieu de culture par filtration tangentielle permet une bonne répartition du milieu dans la chambre de culture, sans stress hydrodynamique,

particulièrement néfaste pour ces cellules et également une bonne répartition des cellules en suspension dans l'ensemble de la chambre de culture.

Le dispositif selon la présente invention peut inclure des variantes relatives à la disposition des capillaires et des tamis microniques, telles que décrites 5 dans le Brevet européen EP 0 474 847.

En particulier :

- les sous-ensembles de capillaires peuvent être simples et constituer une seule couche ;
 - lesdits sous-ensembles de capillaires peuvent être eux-mêmes 10 formés de plusieurs couches superposées de capillaires parallèles entre eux, les capillaires d'une couche régnant au droit des intervalles entre capillaires des deux couches adjacentes ;
 - lesdits capillaires sont des tuyaux perméables aux gaz de diamètre compris entre 0,5 et 5 millimètres, à paroi hydrophobe ;
- 15 - ledit tamis micronique (M) recouvre au moins chaque face libre aval de l'ensemble des capillaires ;
 - les capillaires (C) peuvent être orientés parallèlement au plan de la nappe des tubes (T), peuvent être parallèles aux tubes (T) ou répartis dans l'espace cellulaire libre entre les tubes (T) ;
- 20 - la nappe de tubes (T) et l'ensemble ou sous-ensembles de capillaires (C) sont séparés par un tamis micronique (M'₁, M'₂) semblable au tamis micronique (M) formant la troisième paroi dudit dispositif ;
 - le dispositif peut constituer un module unilatéral, comprenant un seul ensemble de capillaires (C) situé d'un côté de la nappe de tubes (T) et au moins un 25 tamis micronique aval (ou de sortie) (M), un module bilatéral ou symétrique, comprenant au moins deux sous-ensembles de capillaires (C) s'étendant respectivement de chaque côté de la nappe de tubes (T) et au moins un tamis micronique aval (ou de sortie) (M₁, M₂), recouvrant chaque sous-ensemble de capillaires (C) ou il comprend au moins deux modules symétriques superposés, avec suppression éventuelle des espaces de sortie et tamis microniques intermédiaires ;
- 30 - le dispositif peut aussi comprendre une enceinte (E) traversée par au moins deux nappes de tubes (T) et dont l'espace entre les tubes (T) est rempli de capillaires (C) parallèles auxdits tubes, entre deux tamis microniques (M₁, M₂) d'extrémité.

35 Un tel bioréacteur permet de contrôler l'apport d'oxygène de façon indépendante de l'apport de milieu de culture frais, en continu, avec une répartition homogène sur toute la zone de culture, grâce au réseau de capillaires qui la parcourt.

Une telle structure est particulièrement bien adaptée à la culture de cellules hématopoïétiques, car elle se rapproche de la situation *in vivo* des capillaires sanguins.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit bioréacteur, il inclut en outre un circuit en boucle fermée de recyclage du milieu usé.

5 Un tel bioréacteur permet en outre d'apporter le milieu de culture frais et d'éliminer ou de recycler le milieu usé en continu et de modifier le flux et la composition du milieu de culture, selon les besoins (optimisation des conditions de culture).

10 Selon un autre mode de réalisation dudit dispositif, il comprend en outre un système de mesure optique pour suivre en continu la densité cellulaire.

Un tel bioréacteur est particulièrement bien adapté à la mise en œuvre d'un procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile qui comprend :

15 - la séparation des cellules hématopoïétiques, notamment à partir de sang de cordon, de moelle osseuse ou de sang périphérique,

- la mise en suspension desdites cellules dans un milieu de culture convenable, tel qu'un milieu IMDM (*Iscove Modified Dulbecco's Medium*), (L Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1994, 86, 475-482), pour obtenir 10^3 à 10^9 cellules hématopoïétiques/ml,

20 - l'injection de ladite suspension, à une vitesse n'endommageant pas lesdites cellules, dans un dispositif tel que défini ci-dessus, alimenté simultanément avec des gaz convenables (O_2 et CO_2), un milieu de culture liquide frais et des facteurs de croissance, de manière à ce que le débit de milieu de culture frais soit compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et à ce que le flux de facteurs de croissance soit dissocié et séquentiel par rapport au flux de milieu de culture liquide frais,

- la culture desdites cellules pendant 6 à 28 jours à $37^\circ C$ en atmosphère enrichie en CO_2 (enrichissement en CO_2 compris entre 3,5 et 7,5 %) et appauvrie en O_2 (appauvrissement de l'ordre de 5 à 20 %) et

30 - la collecte (par exemple par chasse, par sédimentation ou par basculement du bioréacteur) des cellules en fin de culture.

Des conditions de culture optimales des cellules hématopoïétiques sont étudiées depuis plusieurs années et ont fait l'objet de publications (X. Drouet et al., *Br. J. Haematol.*, 1989, 73, 143-147 ; L Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1991, 79, 35 27-32 ; L. Douay et al., *Br. J. Haematol.*, 1994, 86, 475-482 ; A. Poloni et al, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1995, 37, 367-373) ; toutefois, il n'était pas possible, jusqu'à présent de les mettre en oeuvre dans un procédé reproductible et permettant d'obtenir

des densités cellulaires importantes, alors qu'une telle source de cellules hématopoïétiques présente un intérêt dans toutes les applications de ces cellules, notamment les greffes, la production de types cellulaires particuliers...etc.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un bioréacteur comprenant une chambre de culture cellulaire délimitée par une enceinte et comprenant au moins une paroi intérieure sous la forme d'un tamis micronique assurant le confinement des cellules en milieu liquide et permettant la sortie du milieu de culture usé, lequel tamis micronique présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 µm et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire, qui inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméables aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, un collecteur d'entrée de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture liquide frais, des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambres/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que des moyens d'ensemencement et des moyens de collecte des cellules, pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques.

La présente invention a également pour objet un kit de culture à usage unique pour l'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif tel que défini ci-dessus.

La présente invention a, en outre, pour objet un appareil de culture pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un dispositif, tel que défini ci-dessus, associé à des moyens de régulation des conditions de culture,
- un système de contrôle-commande incluant des moyens de saisie et de stockage des données nécessaires au contrôle dudit dispositif et notamment à la mise en service et à l'arrêt des moyens d'apport de milieu de culture frais, des moyens d'apport des différents facteurs de croissance et des moyens de régulation des flux, suivant une séquence prédéfinie et des moyens de régulation des conditions de culture (température, pH, teneur en O₂, ...),
- une enceinte thermostatée apte à recevoir ledit dispositif, et
- des réservoirs de réactifs disposés, dans des conteneurs réfrigérés (réservoir de milieu de culture frais et réservoirs de facteurs de croissance) ou non

(réervoir de milieu de culture usé et réservoir de collecte des cellules en fin de culture).

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à 5 des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- les figures 1 et 2 représentent des vues schématiques d'un appareil mettant en oeuvre un bioréacteur (BR) selon l'invention, apte à la culture et à l'amplification de cellules hématopoïétiques ;
- 10 - la figure 3 illustre l'expansion cellulaire des cellules de sang de cordon décongelées mises en culture dans un bioréacteur selon l'invention ;
- la figure 4 illustre l'expansion des différents compartiments après 14 jours de culture.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés 15 uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

La figure 1 représente une vue schématique d'un appareil mettant en oeuvre un dispositif selon l'invention (bioréacteur) apte à la culture et à l'amplification de cellules hématopoïétiques ; une chambre de culture cellulaire (X) 20 est incluse dans une enceinte thermostatée (E) ; ladite chambre de culture cellulaire X, délimitée par une enceinte, comprend :

une première paroi intérieure, située à l'une des extrémités de ladite chambre de culture cellulaire et constituée d'un premier tamis micronique M₁ qui assure le confinement des cellules dans la chambre X mais permet le passage du 25 milieu usé à récupérer, au niveau du collecteur de sortie 14,

un ensemble de capillaires C qui assurent le passage des fluides gazeux,

une deuxième paroi intérieure, située à l'autre extrémité opposée de ladite chambre de culture cellulaire et constituée d'un second tamis micronique M₂, qui assure le confinement des cellules dans la chambre X, à l'autre extrémité de ladite chambre et, éventuellement un deuxième ensemble de capillaires C (non représenté sur cette figure).

Les moyens d'apport en milieu frais sont dissociés et comprennent plusieurs réservoirs (R₁...R_n), situés dans un conteneur réfrigéré ; ils comprennent des réactifs différents, dont le débit d'entrée dans la chambre de culture cellulaire X est modulable : les différents réservoirs sont reliés entre eux par des tubulures 10' débouchant dans une canalisation 10, et coopèrent avec des moyens de régulation du débit 35

desdits réactifs (pompes d'appoint en réactifs P_1-P_n) ; la canalisation 10 est reliée à un collecteur d'entrée 13 des réactifs.

L'édit bioréacteur comprend en outre des moyens d'injection X_2 stériles des cellules hématopoïétiques, reliés à la chambre de culture cellulaire X par la tubulure X_1 et des moyens de collecte X_3 des cellules en fin de culture, reliés à la chambre de culture cellulaire X par la tubulure X_4 , éventuellement associée à une pompe d'aspiration X_5 .

Des conduits 12 de sortie du milieu usé, débouchant en aval du tamis M_1 permettent d'extraire ledit milieu usé collecté, au niveau du collecteur 14.

Des moyens d'entrée Ge et de sortie Gs des fluides gazeux sont reliés respectivement à un volume d'alimentation (R_s) des capillaires C et un volume d'échappement (R_e) des capillaires.

Dans la réalisation illustrée à la figure 1 :

- les capillaires C sont, dans le même plan ;
- en amont de l'entrée gazeuse Ge, on peut trouver un filtre stérile ;
- la chambre de culture cellulaire X est associée à un dispositif de régulation de la température, à des moyens d'injection des cellules hématopoïétiques (X_2 , X_1) et à des moyens de collecte des cellules en fin de culture (X_3 , X_4 , X_5) ;
- le milieu frais et les facteurs de croissance sont introduits par filtration frontale, au niveau du collecteur d'entrée 13 ;
- les conduits d'évacuation de milieu usé (moyens 12) peuvent être associés à des réservoirs appropriés (R_u) et sont remis en circulation (boucle fermée B1).

Le fonctionnement de tels bioréacteurs est le suivant :

Après programmation de la température, du pH, et du débit des gaz et des réactifs, on inocule une quantité appropriée de cellules dans la chambre de culture cellulaire X et l'on régule le débit des réactifs provenant des différents réservoirs ($R_1 \dots R_n$) par les moyens d'apport (10', 10) vers le collecteur 13. On surveille :

- le débit de milieu frais, de manière à ce qu'il soit modulé, en fonction des cellules à cultiver et du stade d'avancement de la culture (variation de la vitesse de renouvellement du flux de milieu, dont la composition varie en fonction du temps) ainsi que
- les paramètres précisés ci-dessus (température, pH, densité cellulaire et concentrations en O_2 et en CO_2).

Simultanément, les cellules sont alimentées en oxygène et en gaz carbonique par l'intermédiaire des capillaires C, répartis uniformément dans la chambre de culture cellulaire (espace délimité par les parois intérieures constituées les

tamis microniques d'extrémité, à partir d'une arrivée gazeuse Ge). Les capillaires diffusent le gaz de l'intérieur de chaque capillaire vers les cellules mais s'opposent à la diffusion de liquide à l'intérieur desdits capillaires. La sortie Gs des gaz permet également l'évacuation du CO₂ produit par les cellules en culture. La sortie de gaz Gs permet d'évacuer l'oxygène et le gaz carbonique non utilisés.

Un tel bioréacteur d'un volume qui peut varier de 1 cm³ à 10 l, permet de réaliser des cultures en continu.

Dans une réalisation préférée mais non limitative dudit bioréacteur : les capillaires C d'alimentation en fluides gazeux, sont sous la forme d'une pluralité de tuyaux perméables aux gaz espacés régulièrement dans la chambre cellulaire X, d'un diamètre de 2,6 mm dans la réalisation représentée, et sont situés dans l'ensemble de la chambre de culture cellulaire X.

On inocule dans le dispositif stérile, par exemple et ce de manière non limitative, des cellules de cordon (10⁶ cellules/ml de milieu, à la vitesse de 0,5 ml/min.).

Le milieu frais à composition modulable est ensuite introduit par la tubulure d'entrée 10 vers le collecteur 13, avec un débit variable d'alimentation compris entre 1 et 6 volume-chambre/j.

Les cellules produites sont récupérées de préférence entre le 8^{ème} et 20 le 21^{ème} jour.

Les cellules obtenues peuvent avantageusement être utilisées dans toutes les applications de ces cellules (greffes, production de types cellulaires particuliers).

Lorsque le bioréacteur prévoit que le milieu frais est introduit par filtration tangentielle (figure 2), il comprend outre les moyens tels que définis à la figure 1, des tubes T d'alimentation en milieu frais, par exemple d'un diamètre de 1 cm, qui sont rigides ; ces tubes sont dans la réalisation représentée à la figure 2, et de manière non limitative, en graphite compacté recouvert d'une couche sensible permettant le contrôle du diamètre des pores et ont été préalablement stérilisés ; dans ce cas :

30 . un premier sous-ensemble de capillaires C assurent le passage des fluides gazeux et sont disposés entre le tamis M₁ et une nappe de tubes T, parallèles entre eux et qui assurent le passage du milieu nutritif frais vers les cellules,

35 . un second tamis micronique M₂ qui assure le confinement des cellules dans la chambre X, à l'autre extrémité de ladite chambre est associé à un deuxième sous-ensemble de capillaires C, disposé entre le tamis M₂ et la nappe de tubes T.

Les tubes T peuvent éventuellement être montés en parallèle entre deux collecteurs alimentés suivant un circuit en boucle fermée incluant une tubulure d'entrée d'apport du milieu nutritionnel frais et une tubulure de sortie dudit milieu frais à recycler, lesquelles tubulures sont reliées entre elles par une canalisation (figure 2, 5 B2).

Dans la réalisation illustrée à la figure 2 :

- les capillaires C sont, dans le même plan, perpendiculaires aux tubes T et sont disposés en deux sous-ensembles, de part et d'autre de la nappe de tubes T ;
 - 10 - en amont de l'entrée gazeuse Ge, on peut trouver un filtre stérile ;
 - la chambre de culture cellulaire X est associée à un dispositif de régulation de la température, à des moyens d'injection des cellules hématopoïétiques (X₂, X₁) et à des moyens de collecte des cellules en fin de culture (X₃, X₄, X₅) ;
 - les conduits d'évacuation de milieu usé (moyens 12) peuvent être 15 associés à des réservoirs appropriés.

EXEMPLE 1 :

** Matériel et méthodes.*

- Séparation des cellules issues du sang de cordon :

20 40 ml de sang de cordon sont recueillis à la maternité dans des poches prévues à cet effet (poches Macopharma réf. MSA 1200A). La poche est manipulée dans les 2 heures suivant le recueil. Le sang est dilué volume à volume dans du PBS sans Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (Gibco), centrifugé en tube de 15 ml à 1 300 g pendant 10 min. Le *buffy coat* (« galette » de leucocytes totaux) est aspiré à la pipette pasteur, puis 25 resuspendu dans du milieu d'Iscove modifié par Dulbecco (IMDM, Gibco). La viabilité des cellules est déterminée par exclusion au bleu trypan (Gibco). Les cellules sont ajustées à 2.10⁷ cellules/ml en IMDM et maintenues à +4°C jusqu'à la congélation. Le milieu de congélation, contenant 80 % de sérum de veau foetal (SVF) et 20 % de DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma D2650), est lui aussi réfrigéré à +4°C 30 avant son utilisation. Ce mélange est déposé goutte à goutte sur les cellules du *buffy coat*. Les cellules sont alors transvasées dans des cryotubes et maintenues à -80°C jusqu'à utilisation.

La décongélation des cellules s'opère rapidement par immersion du cryotube dans un bain-marie à 39°C. Les cellules décongelées sont immédiatement 35 diluées au 1/20 dans un mélange d'IMDM + 10 % SVF et lavées une fois à +4°C. Les cellules sont resuspendues en IMDM + 0,5 % BSA (sérum albumine bovine, Sigma A4503) et la viabilité des cellules est déterminée.

- Cultures liquides :

Les cellules sont suspendues à 10^6 cellules/ml dans un milieu de base défini sans sérum (SF) contenant 10 mg/ml d'acide folique (F7876, Sigma), 2,6 mM de L-glutamine (Gibco), 1,5 U/ml d'héparine (Fournier), 10^{-6} M d'hémisuccinate d'hydrocortisone (H4881, Sigma), 40 U/ml de pénicilline et 40 mg/ml de streptomycine (Gibco). Le milieu est supplémenté par 5 mg/ml de BSA, 150 mg/ml de transferrine humaine saturée en fer (T7786, Sigma), 100 mg/ml d'insuline recombinante humaine (I0259, Sigma), 30 mg/ml de lécithine de soja (P3782, Sigma) et 7,5 mg/ml de cholestérol (C3045, Sigma).

Le milieu défini sans sérum est supplémenté par 100 ng/ml de *Stem Cell Factor* (SCF, Immunex), 100 ng/ml de ligand de FLT3 (ligand pour le récepteur de la thyrosine kinase Flat-/flak2) (FLT3-I, Immunex), 5 ng/ml d'IL3 (Sandoz), 10 ng/ml d'IL6 (Sandoz), 10 ng/ml de G-CSF (Shugai Rhone Poulenc) et 0,5 U/ml d'érythropoïétine (Epo, Behring).

15 - Ensemencement des Bio-Réacteurs (BR) :

a) Préparation des BR :

Avant utilisation, les BR montés (circuit de tubulures, chambres d'incubation et flacon de recueil) sont autoclavés 30 min à 1 bar puis laissés quelques heures à température ambiante pour assurer leur descente en température.

20 Afin d'éliminer l'air résidant dans le montage, le circuit de tubulures des BR est alors purgé avec le milieu SF complet contenant les cytokines.

b) Ensemencement :

25 3,6 10^6 cellules de *buffy coat* décongelé du sang de cordon sont ajustées à 10^6 cellules/ml. Les cellules sont injectées dans la chambre d'incubation des BR (volume de la chambre 3,6 ml) à l'aide d'un moyen d'ensemencement, à la vitesse de 0,5 ml/min. Les BR ensemencés sont ensuite installés dans une étuve à 37°C alimentée en CO₂ à 5 %.

30 La ventilation des cellules est assurée à l'aide d'un compresseur aspirant directement l'atmosphère de l'étuve. Des moyens d'apport du milieu de culture frais, des moyens d'apport des différents facteurs de croissance, ainsi que des moyens de régulation dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance (pompes P1-Pn) permettent d'assurer aux cellules, une alimentation modulée en milieu. Pour l'expérience, 2 BR sont ensemencés, l'un (BR1) dont le débit sera constant pendant les 14 jours de la culture, c'est-à-dire : 3,6 ml/j soit 35 1 volume-chambre/j, l'autre (BR2) dont le débit variera de 1 à 4 vol-ch/j.

A partir du 5ème jour de la culture une numération cellulaire des BR est effectuée sur un aliquot quotidiennement ; le débit du BR2 étant ajusté en fonction de l'expansion cellulaire à concurrence de 4 vol-ch/j.

Parallèlement, un témoin de culture en condition statique est initié 5 en plaque 6-puits à raison de $1,8 \cdot 10^6$ cellules/1,8 ml. L'entretien du témoin est assuré à J6 par adjonction de 1,8 ml de milieu complet fraîchement préparé contenant les cytokines.

10 Au jour 14 de la culture, les cellules des BR et du témoin sont recueillies en totalité et lavées en PBS. La viabilité des cellules est déterminée. Sur chaque échantillon, la morphologie des cellules est évaluée par une cytologie sur lame colorée au May Grünwald Giemsa. Les progéniteurs granulo-macrophagiques (CFU-GM) et érythroïdes (BFU-E) sont plantés à partir des différents échantillons. Les CFU-GM et BFU-E sont plantés en méthyl-cellulose (Sigma) stimulée par 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml d'IL3, 3 U/ml d'Epo, 20 ng/ml de GM-CSF et de G-CSF. La lecture 15 des colonies s'effectue après 14 jours d'incubation à 37°C sous 5 % CO₂. 2 500 cellules/boîte sont plantées à J0 de la culture et de 2 000 à $3 \cdot 10^4$ cellules à J14 en fonction du nombre de cellules obtenues à J14.

- **Expression des résultats :**

Les résultats sont exprimés en « fois d'expansion par rapport au J0 20 de la culture ». Pour cela, le nombre de cellules ou de progéniteurs obtenus au 14ème jour de la culture liquide est divisé par le nombre de cellules ou progéniteurs générés au départ de l'expérience.

* **Résultats :**

La numération journalière sur des aliquots à partir du J5 des BR1 et 25 BR2 permet de suivre la cinétique d'expansion cellulaire sans qu'il soit nécessaire de « condamner » un BR uniquement à cet effet. A J14, la numération de l'aliquot est doublée par une numération effectuée sur la totalité des cellules récupérées. Après la chute drastique des cellules au cours de la première semaine dans les BR (comportement similaire dans le témoin), la production cellulaire réaugmente peu à 30 peu à partir du J9 de la culture. L'augmentation du débit dans le BR2 accentue la production cellulaire (figure 3). Celle-ci est 2,7 fois plus importante dans le BR à débit variable (BR2) comparativement au BR à débit constant (BR1). Il est intéressant de constater que la production cellulaire du sang de cordon décongelé puis mis en culture en condition statique aboutit, elle, à une perte de 75 % des cellules par rapport au 35 niveau initial, contrairement au BR2 (figure 4A).

La figure 4B montre que l'expansion des progéniteurs granulo-macrophagiques (CFU-GM) varie de 4 à 5 fois par comparaison à J0, par conséquent,

l'amplification des cellules matures obtenues dans le BR2 (figure 4A) ne s'est pas opérée au détriment du compartiment hématopoïétique plus immature à savoir les CFU-GM.

Cette expérience illustre le fait que des cellules du sang de cordon non purifiées (puisque il s'agit de globules blancs totaux), congelées à -80°C pendant 3 mois et mises en culture 14 jours en présence d'un substitut de sérum supplémenté en cytokines dans un BR à débit constant sont capables d'assurer une production cellulaire 2,4 fois plus importante qu'en condition statique. Comparativement au témoin, cette production cellulaire peut-être amplifiée de plus de 6 fois lorsque le débit du BR augmente. De plus, l'expansion de cellules matures permet parallèlement une production réelle des progéniteurs CFU-GM (4 fois, comparativement au niveau initial).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques, du type comprenant une chambre de culture cellulaire (X), délimitée par une enceinte et dans laquelle les 5 cellules à amplifier sont confinées, lequel dispositif est caractérisé :

* en ce que ladite chambre de culture cellulaire comprend au moins une paroi intérieure constituée par un tamis micronique (M_1) assurant le confinement des cellules en suspension dans un milieu de culture liquide et permettant la sortie du milieu usé, lequel tamis micronique (M_1) présente un diamètre de pores compris entre 10 0,1 et 2 μm , et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire,

- en ce qu'elle inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, et

15 * en ce que ladite chambre de culture cellulaire comporte, en outre :
- un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture frais ($R_1 \dots R_n ; 10, 10'$), des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation ($P_1 \dots P_n$) dissociés et séquentiels des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance, le moyen de 20 régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que
- des moyens d'ensemencement (X_1, X_2) des cellules à amplifier et
- des moyens de collecte (X_3) des cellules amplifiées.

25 2°) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture frais est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration frontale.

3°) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit milieu de culture est apporté à la chambre de culture cellulaire par filtration tangentielle, au moyen d'une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu nutritionnel frais, rigides et de diamètre compris entre 1 mm et 20 mm, montés en parallèle entre ledit collecteur d'entrée (13) et ledit collecteur de sortie (14), lesdits tubes (T) étant montés dans un circuit en boucle fermée et parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu nutritionnel frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi, 35 pour maintenir une pression entraînant une perte de charge, lorsque le milieu frais traverse les parois des tubes, supérieur à 10 mbars.

4°) Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que le débit du milieu parcourant chaque tube (T) correspond à une vitesse d'écoulement comprise entre 0,1 et 1 dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

5 5°) Dispositif selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisé en ce que l'ensemble de capillaires (C) sont disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes (T), un/plusieurs sous-ensembles.

10 6°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un système de mesure optique (15) pour suivre en continu la densité cellulaire.

7°) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il inclut en outre un circuit en boucle fermée (B1) de recyclage du milieu usé.

15 8°) Procédé d'amplification de cellules hématopoïétiques en milieu stérile, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la séparation des cellules hématopoïétiques, notamment à partir de sang de cordon, de moelle osseuse ou de sang périphérique,

- la mise en suspension desdites cellules dans un milieu de culture convenable, pour obtenir 10^3 à 10^7 cellules hématopoïétiques/ml,

- l'injection de ladite suspension, à une vitesse n'endommageant pas lesdites cellules, dans un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, alimenté simultanément avec des gaz convenables (O_2 et CO_2), un milieu de culture liquide frais et des facteurs de croissance, de manière à ce que le débit de milieu de culture frais soit compris entre 0 et 50 volumes-chambre/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et à ce que le flux de facteurs de croissance soit dissocié et séquentiel par rapport au flux de milieu de culture liquide frais,

- la culture desdites cellules pendant 6 à 28 jours à $37^\circ C$ en atmosphère enrichie en CO_2 et appauvrie en O_2 et

30 - la collecte des cellules en fin de culture.

9°) Utilisation d'un bioréacteur comprenant une chambre de culture cellulaire (X) délimitée par une enceinte et comprenant au moins une paroi intérieure sous la forme d'un tamis micronique (M_1) assurant le confinement des cellules en milieu liquide et permettant la sortie du milieu de culture usé, lequel tamis micronique (M_1) présente un diamètre de pores compris entre 0,1 et 2 μm et constitue au moins la paroi intérieure aval de la chambre de culture cellulaire, qui inclut un ensemble de capillaires (C) à paroi perméables aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux

pour former un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules, un collecteur d'entrée (13) de milieu de culture qui coopère avec des moyens d'apport du milieu de culture liquide frais, des moyens d'apport de différents facteurs de croissance et des moyens de régulation dissociés et séquentiels
5 des flux de milieu de culture frais et de facteurs de croissance ($R_1 \dots R_n$; $P_1 \dots P_n$; 10 ; 10'), le moyen de régulation du flux de milieu frais permettant d'obtenir un débit variable de milieu de culture compris entre 0 et 50 volumes-chambres/jour, de préférence entre 0 et 6 volumes-chambre/jour et un collecteur de sortie (14) du milieu de culture, qui coopèrent avec des moyens de mise sous pression, ainsi que des moyens
10 d'ensemencement (X_1 ; X_2) et des moyens de collecte (X_3) des cellules, pour l'amplification en milieu stérile de cellules hématopoïétiques

10°) Kit de culture à usage unique pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

15 11°) Appareil de culture pour l'amplification de cellules hématopoïétiques, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, associé à des moyens de régulation des conditions de culture,
- un système de contrôle-commande incluant des moyens de saisie et
20 de stockage des données nécessaires au contrôle dudit dispositif et notamment à la mise en service et à l'arrêt des moyens d'apport de milieu de culture frais, des moyens d'apport des différents facteurs de croissance et des moyens de régulation des flux, suivant une séquence prédéfinie et des moyens de régulation des conditions de culture,
- une enceinte (E) thermostatée apte à recevoir ledit dispositif, et
25 - des réservoirs de réactifs ($R_1 \dots R_n$) disposés, dans des conteneurs réfrigérés (réservoir de milieu de culture frais et réservoirs de facteurs de croissance) ou non (réservoir de milieu de culture usé et réservoir de collecte des cellules en fin de culture).

1 / 4

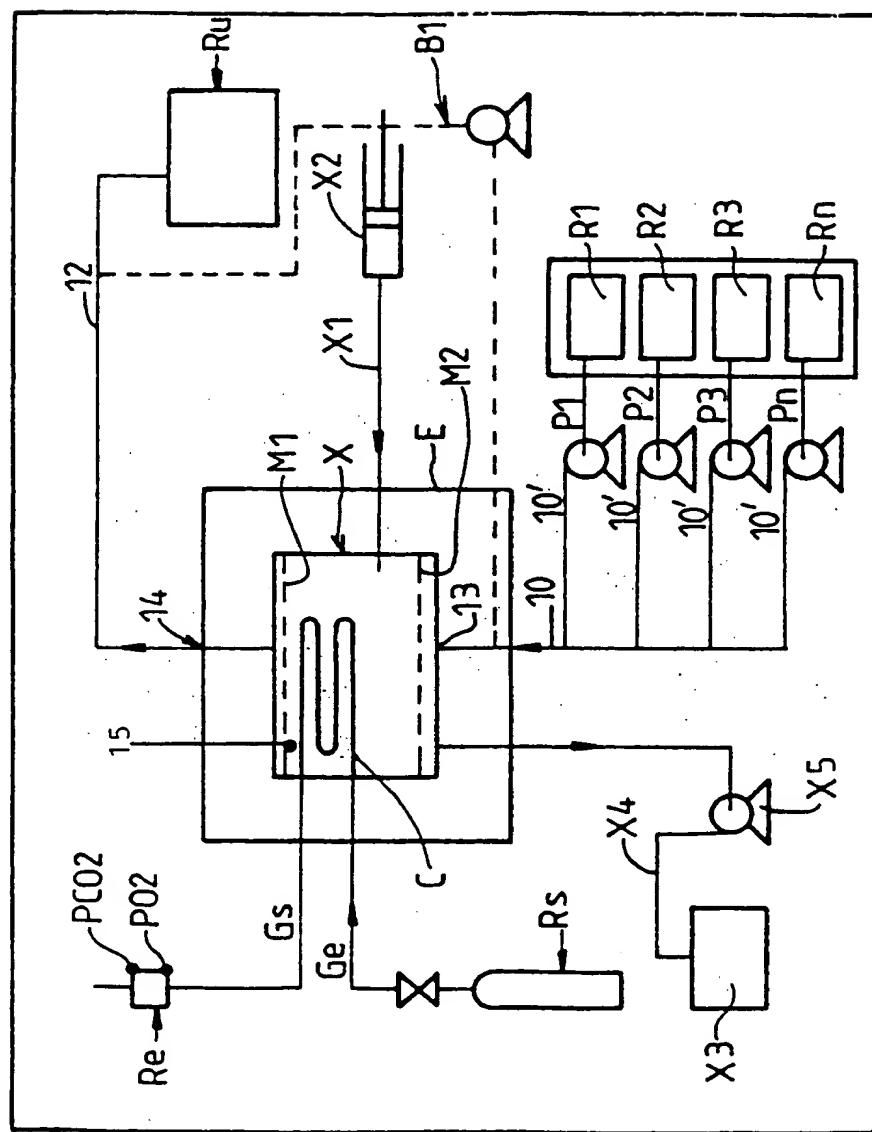


FIG. 1

2 / 4

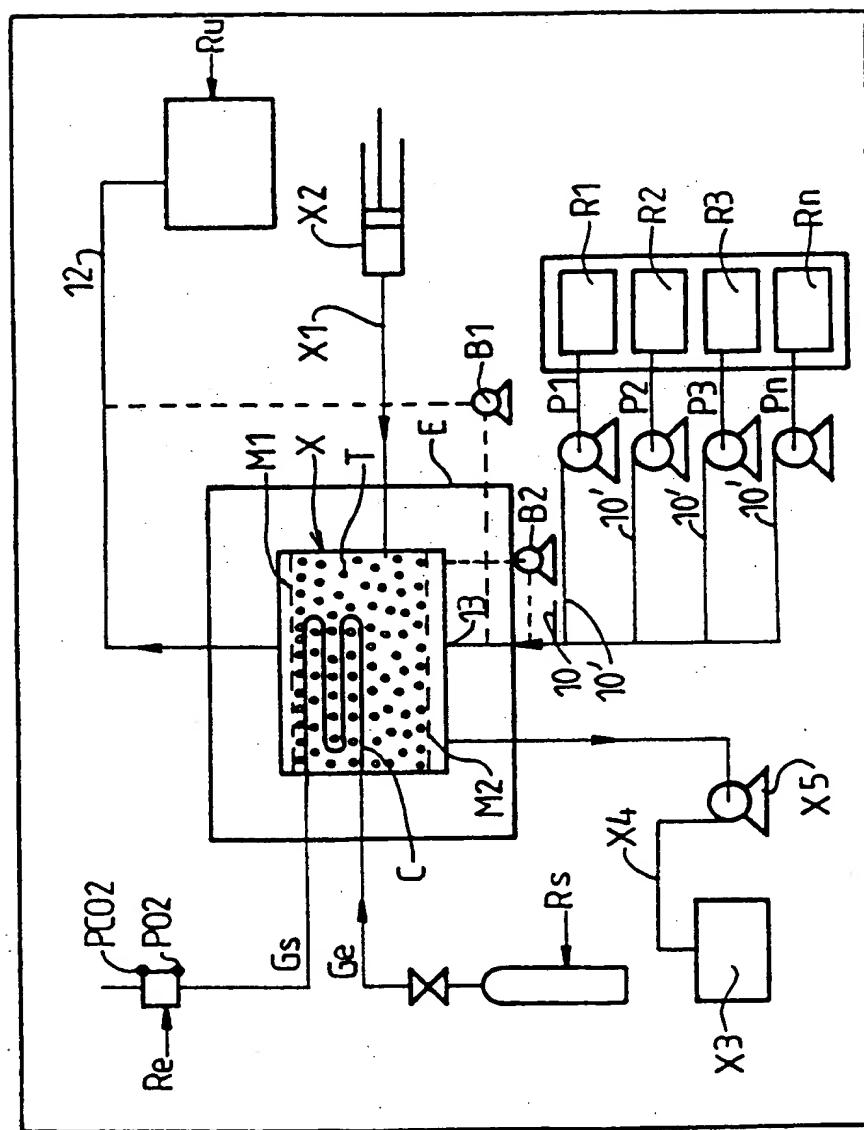


FIG. 2

3 / 4

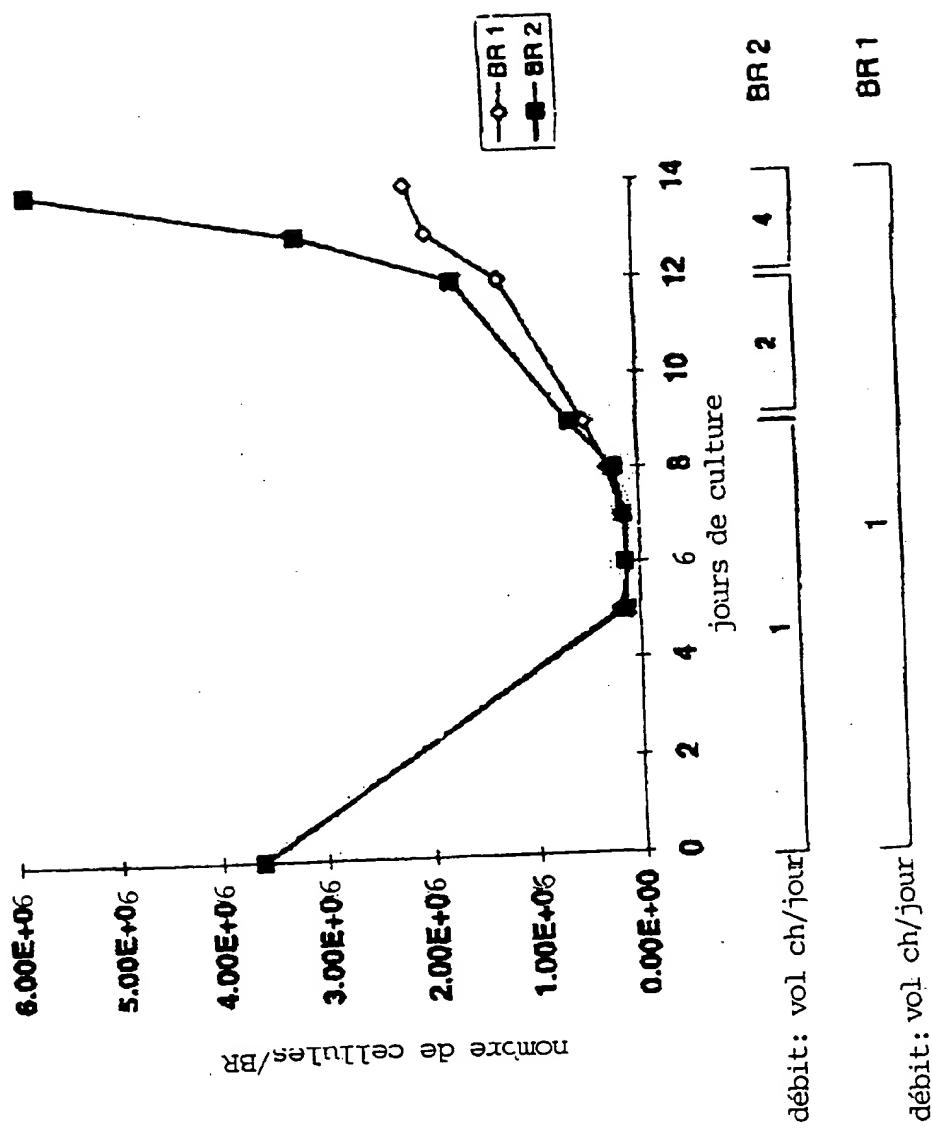


FIGURE 3

4 / 4

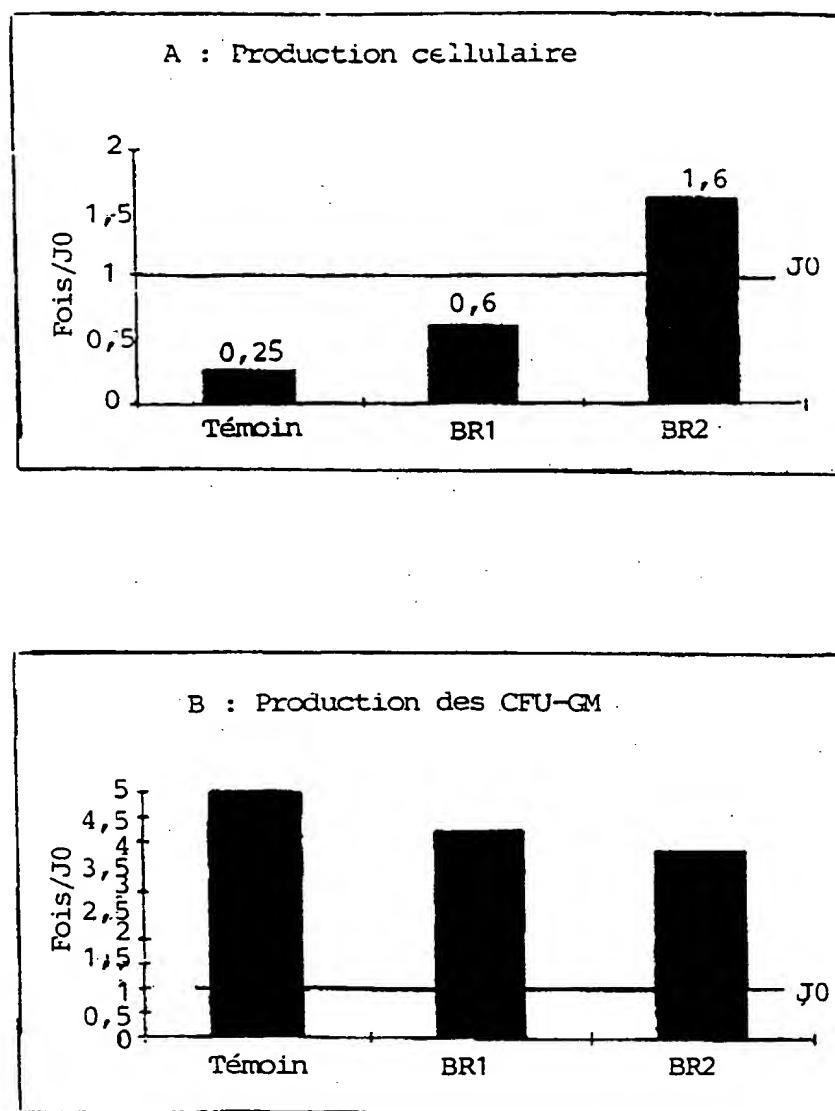


FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.

PCT/FR 98/02548

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 15570 A (BERTIN & CIE) 17 October 1991 see the whole document	1-5, 7, 11
Y	& EP 0 474 847 A (BERTIN & CO) cited in the application ----	8-10
Y	WO 93 18132 A (UNIV MICHIGAN) 16 September 1993 see page 30; claims; figures -----	8-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 1999

Date of mailing of the international search report

08/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2
NL -2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02548

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9115570	A 17-10-1991	FR AT CA DE DE EP GR JP US	2660323 A 127837 T 2054761 A 69112965 D 69112965 T 0474847 A 92300050 T 5500616 T 5290700 A	A T A D T A T T A	04-10-1991 15-09-1995 01-10-1991 19-10-1995 04-04-1996 18-03-1992 31-08-1992 12-02-1993 01-03-1994
WO 9318132	A 16-09-1993	AU CA EP JP US US	685743 B 2131385 A 0629236 A 7504570 T 5459069 A 5763266 A	B A A T A A	29-01-1998 16-09-1993 21-12-1994 25-05-1995 17-10-1995 09-06-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : Internationale No :

PCT/FR 98/02548

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12M3/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suiv: des symboles de classement)

CIB 6 C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 91 15570 A (BERTIN & CIE) 17 octobre 1991	1-5,7,11
Y	voir le document en entier & EP 0 474 847 A (BERTIN & CO) cité dans la demande ---	8-10
Y	WO 93 18132 A (UNIV MICHIGAN) 16 septembre 1993 voir page 30; revendications; figures -----	8-10

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 mars 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/03/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De. de Internationale No

PCT/FR 98/02548

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9115570 A	17-10-1991	FR 2660323 A AT 127837 T CA 2054761 A DE 69112965 D DE 69112965 T EP 0474847 A GR 92300050 T JP 5500616 T US 529C700 A	04-10-1991 15-09-1995 01-10-1991 19-10-1995 04-04-1996 18-03-1992 31-08-1992 12-02-1993 01-03-1994
WO 9318132 A	16-09-1993	AU 685743 B CA 2131385 A EP 0629236 A JP 7504570 T US 5459069 A US 5763266 A	29-01-1998 16-09-1993 21-12-1994 25-05-1995 17-10-1995 09-06-1998